植 物 分 类 学 报 44 (3): 296–303(2006) doi:10.1360/aps040100
Acta Phytotaxonomica Sinica http://www.plantsystematics.com

云南铁角蕨与泸山铁角蕨的关系：来自叶绿体 *rbc*L、*trn*L-F和*rps4-trn*S序列的证据

[1]李春香 [2]陆树刚

[1](中国科学院南京地质古生物研究所现代古生物学和地层学国家重点实验室 南京 210008)

[2](云南大学生态学与地植物学研究所 昆明 650091)

Relationship of *Asplenium yunnanense* and *A. lushanense* inferred from the sequence analysis of chloroplast *rbc*L, *trn*L-F and *rps4-trn*S

[1]LI Chun-Xiang [2]LU Shu-Gang

[1](*State Key Laboratory of Palaeobiology and Stratigraphy of Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, the Chinese Academy of Sciences*, Nanjing 210008, China)

[2](*Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University*, Kunming 650091, China)

Abstract The relationship between *Asplenium yunnanense* Franch. and *Asplenium lushanense* C. Chr. has long been in dispute, and here was evaluated based on the sequence analysis of chloroplast *rbc*L gene, *trn*L-F and *rps4-trn*S intergenic spacers. No sequence difference in the studied chloroplast DNA regions was found between *Asplenium lushanense* and *A. yunnanense*, but some nucleotide differences in the corresponding DNA fragments were found among other *Asplenium* species. So, *A. yunnanense* and *A. lushanense* cannot be distinguishable in terms of chloroplast DNA sequences, and the very close relationship between them is further affirmed based on the evidence from molecular data.

Key words *Asplenium yunnanense*, *Asplenium lushanense*, chloroplast DNA sequence, relationship.

摘要 云南铁角蕨*Asplenium yunnanense*与泸山铁角蕨*Asplenium lushanense*的分类是一个悬而未决的问题。本文对云南铁角蕨与泸山铁角蕨及近缘类群的叶绿体*rbc*L基因和 *trn*L-F、*rps4-trn*S基因间隔区序列进行PCR扩增和序列分析；并与已经发表的铁角蕨属植物的相应序列进行比较，发现云南铁角蕨与泸山铁角蕨的*rbc*L基因和*trn*L-F、*rps4-trn*S基因间隔区序列之间均未表现出差异，因此叶绿体DNA序列的证据不能将云南铁角蕨与泸山铁角蕨分开，从而从分子系统学方面证明云南铁角蕨与泸山铁角蕨是一对亲缘关系非常近的物种。

关键词 云南铁角蕨；泸山铁角蕨；叶绿体DNA序列；亲缘关系

云南铁角蕨*Asplenium yunnanense* Franch.与泸山铁角蕨*Asplenium lushanense* C. Chr.的分类是一个长期悬而未决的问题。前者模式标本采自云南大理，叶轴顶端通常无芽胞，也未伸长为鞭状，羽片短披针形，彼此接近；而后者模式标本采自四川西昌(泸山)，叶轴顶端通常有芽胞，伸长为鞭状，羽片短矩圆形，彼此远离。但这两个物种之间也有一些过

————————————

2004-08-23 收稿, 2005-04-22 收修改稿。

基金项目：国家自然科学基金项目(40302003，30370116)；中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-SW-130) (Supported by the National Natural Science Foundation of China, Grant Nos. 40302003, 30370116, and a Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences, Grant No. KZCX2-SW-130)。

渡的形态特征。因此，有学者主张将这两个物种分开(孔宪需，1988)，也有学者主张将这两个物种合并(吴兆洪，1999)。为了进一步探讨这两个物种的分类问题，王中仁等(2003)在细胞层次上进行了研究，证明云南铁角蕨与泸山铁角蕨的染色体数目不相同，应该分开。本研究拟应用分子系统学方法为这两个物种的关系寻找证据。在研究中我们首先利用叶绿体基因组编码磷酸核酮糖羧化酶大亚基(*rbc*L)的基因序列，探讨了这两个物种及其近缘类群在铁角蕨属植物中的系统位置，考虑到单个基因序列所能提供的信息往往有限，而且利用编码的基因(演化速率往往较慢)进行生物类群系统演化研究时，在解决演化快的物种间的亲缘关系时效果往往较差，因此我们同时分析了这两个物种及其近缘类群叶绿体基因组演化速率比较快的非编码DNA序列，即*trn*L-F、*rps4-trn*S基因间隔区序列，以此为云南铁角蕨与泸山铁角蕨的关系及分类提供分子方面的证据。

1　材料和方法

1.1　实验材料

由于云南铁角蕨与泸山铁角蕨在形态分类上归于铁角蕨组sect. *Asplenium* (吴兆洪，1999)，本文选取同组的另外6种材料，其中3种(北京铁角蕨*Asplenium pekinense* Hance、黔铁角蕨*Asplenium interjectum* Christ和变异铁角蕨*Asplenium varians* Wall. ex Hooh. & Grev.)与云南铁角蕨和泸山铁角蕨属于同一系(变异叶系ser. *Variantia*)。供试材料为新鲜叶片，采集后迅速用硅胶干燥，回到实验室后进行总DNA提取及序列分析。凭证标本保存在云南大学蕨类植物标本室(PYU)及实验室，以备查验。样品产地等信息详见表1。

表**1**　本文用于序列测定的样品及其序列的基因库登录号
Table 1　Samples used in sequence analysis and their sequence GenBank accession number

种名 Species	采集地 Locality	标本号 Specimen No.	基因库序列号 Genbank Accession No.		
			*rbc*L	*trn*L-F	*rps4-trn*S
黔铁角蕨 *Asplenium interjectum* Christ	云南西酬 Xichou, Yunnan	Lu SG/J12 (PYU)	AY545480	AY725038	AY725043
泸山铁角蕨 *A. lushanense* C. Chr.	云南昆明西山 Mt. Xishan, Kunming, Yunan	Lu SG/D21 (PYU)	AY545481	AY725033	AY725042
北京铁角蕨 *A. pekinense* Hance	云南广南 Guangnan, Yunnan	Lu SG/C67 (PYU)	AY545479	AY725037	AY725040
西南铁角蕨 *A. praemorsum* Sw.	云南哀牢山 Mt. Ailaoshan, Yunnan	Lu SG/A12 (PYU)	AY725029	_	_
变异铁角蕨 *A. varians* Wall. ex Hook. & Grev.	云南昆明金殿公园 Jingdian Park, Kunming, Yunnan	Lu SG/B42 (PYU)	AY545478	AY725035	AY725039
疏齿铁角蕨 *A. wrightioides* Christ	云南西酬 Xichou, Yunnan	Lu SG/J13 (PYU)	AY725031	AY725032	AY725044
胎生铁角蕨 *A. yoshinagae* Makino	云南哀牢山 Mt. Ailaoshan, Yunnan	Lu SG/A4 (PYU)	AY725030	AY725036	AY725045
云南铁角蕨 *A. yunnanense* Franch.	云南昆明西山 Mt. Xishan, Kunming, Yunnan	Lu SG/D22 (PYU)	AY545482	AY725034	AY725041

1.2 总DNA提取

总DNA的提取采用CTAB法(Hillis et al., 1996), 并根据施苏华等(1996)的方法略作修改。

1.3 序列测定

1.3.1 引物的设计 扩增*rbc*L基因及*trn*L-F和*rps4-trn*S基因间隔区及测序所用引物如表2, 其中扩增及测序*rbc*L基因所用引物参照Little和Barrington(2003)以及Li等(2004)设计, *trn*L-F参照Taberlet等(1991)设计, *rps4-trn*S基因间隔区片段参照Hennequin等(2003)设计, 但其序列均略作修改。

表2 本文用于DNA序列扩增及测定所用的引物
Table 2 Specific primers used to amplify and sequence DNA fragments in this study

引物 Primer	方向 Direction	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′ to 3′)
RbcL 1	正向forward	ATG TCA CCA CAA ACG GAG AC
RbcL 424	正向forward	CTG CTT ATT CTA AGA CTT TC
RbcL 878	正向forward	TCA CCG TGC GAT GCA TGC TG
RbcL 1379	反向reverse	GC AGC TAA TTC AGG ACT CC
RbcL 940	反向reverse	CAT GCG TAA TGC TTT GGC
trnL-F E	正向forward	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC
trnL-F F	反向reverse	TTT GAA CTG GTG ACA CGA G
rps4-trnS F	正向forward	ATG TCC CGT TAT CGA GGA CC
trnS	反向reverse	TAC CGA GGG TTC GAA TC

1.3.2 PCR扩增 扩增反应在Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600上进行。反应体积为50 μL, 其成分为: 2 μL DNA模板(约2 ng, 由Gel Doc图像分析仪测得), 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTPs, 1×buffer, 0.25 μmol/L引物(用表2中的引物RbcL 1和RbcL 1379扩增*rbc*L片段, trnL-F E和trnL-F F扩增*trn*L-F片段, 用rps4-trnS F和trnS扩增*rps4-trn*S片段), 0.8 U *Taq* DNA聚合酶(Sangon公司), 1 μg/μL BSA, 5% DMSO。3个DNA片段扩增程序中的预变性和最后延伸步骤均为94 ℃, 2 min和72 ℃, 7 min。扩增3个DNA片段均进行40次循环, 其中变性温度及时间均为94 ℃, 0.5 min, 但退火和延伸的温度及时间各不相同, 分别为42 ℃, 1 min, 72 ℃, 1 min (*rbc*L片段); 52 ℃, 1 min; 72 ℃, 0.5 min (*trn*L-F片段); 56 ℃, 1 min; 72 ℃, 0.5 min (*rps4-trn*S片段)。扩增产物经0.8%—1.2%琼脂糖电泳后用Gel Doc图像分析仪观察, 对于PCR反应特异性高, 无明显非特异反应条带的扩增产物, 用Wizard PCR DNA Purification System(Promega)直接纯化; 对于有明显非特异反应的PCR产物, 先以低熔点琼脂糖凝胶电泳分离并割取目标片段, 再用上述纯化系统进行纯化, 均按照其说明书上的步骤进行操作。

1.3.3 序列测定 序列测定在ABI 377 DNA自动测序仪(PE Applied Biosystems, USA)上完成, 从3'→5'和5'→3' 用表2的所有引物进行测序。序列数据已输入美国生物信息中心(NCBI)的基因库(GenBank)中, 序号见表1。其他从GenBank中得到的序列见表3。

表3 由基因库中下载以用于本文系统发育分析的DNA序列

Table 3 GenBank Accession numbers of downloaded DNA sequences in this study

分类群 Taxon	GenBank 序列号 Accession No.	分类群 Taxon	GenBank 序列号 Accession No.
Asplenium adiantum-nigrum L.	AF318600	*A. nidus* L.	AF525270
A. aethiopicum Bech.	AF240654	*A. normale* Don 倒挂铁角蕨	AB014703
A. antiquum Makino	U30596	*A. normale*	AY300075*
A. antrophyoides Christ	AB097592	*A. obtusatum* Forst.	AY283232
A. aureum Cav.	AF538311	*A. oblongifolium* Col.	AY283231
A. australasicum Hook.	AB013250	*A. octoploideum* Viane & Van den Heede	AF538316
A. bourgaei Boiss. ex Milde	AF318592	*A. oligophlebium* Bak.	AB014700
A. bourgaei	AY300055*	*A. pauperequitum* P. J. Brownsey & Jackson	AY283233
A. bulbiferum G. Forst.	AF318601	*A. pauperequitum*	AY283219*
A. cardiophyllum (Hance) Baker	AB014706	*A. petrarchae* (Guerin) DC.	AF525271
A. caudatum Cav.	AF525264	*A. petrarchae*	AF525252*
A. ceterach L.	AF538313	*A. phillipsianum* (Kümmerle) S. S. Bir	AF538320
A. cheilosorum Kunze. ex Mett. 齿果铁角蕨	AB014704	*A. phillipsianum*	AY164269*
A. cordatum (Thunb.) Sw.	AF538319	*A. phyllitidis* Don	AB097594
A. cordatum	AF525235*	*A. platyneuron* (L.) Oakes ex Eat.	AF525272
A. cuneifolium Viv.	AF525265	*A. platyneuron*	AF525240*
A. cymbifolium Christ	AB097593	*A. polyodon* Forst.	AY283234
A. cyprium Viane & Van den Heede	AF538314	*A. prolongatum* Hook. 长叶铁角蕨	AB014691
A. dalhousiae Hook.	AF538317	*A. pseudo-wilfordii* Tagawa	AB014696
A. emarginatum Pal.	AF525266	*A. punjabense* S. S. Bir, Fraser-Jenk. & J. D. Lovis	AF538318
A. ensiforme Wall. 剑叶铁角蕨	AB014709	*A. riparium* Liebm.	AB014708
A. feei Kunze ex Fée	AF525267	*A. ritoense* Hayata	AB014692
A. flabellifolium Cav.	AY283227	*A. ruprechtii* Kurata	U30606
A. flabellifolium	AY300062*	*A. ruprechtii*	AY300084*
A. flaccidum Forst.	AY283228	*A. ruta-muraria* L.卵叶铁角蕨	AF525273
A. filipes Copel.	U30605	*A. ruta-muraria*	AF525242*
A. fontanum (L.) Bernh.	AF525268	*A. sagittatum* (DC. in Lam. & DC.) A. J. Bange	AF240646
A. fontanum	AF525239*	*A. sandersonii* Hook.	AF525274
A. griffithianum Hook. 厚叶铁角蕨	AB013252	*A. sarelii* Hook. 华中铁角蕨	AB014693
A. haughtonii (Hook.) S. S. Bir, Fraser-Jenk. & J. D. Lovis	AF538321	*A. scolopendrium* L.	AF240645
		A. scolopendrium	AY459169#
A. haughtonii	AF525236*	*A. septentrionale* (L.) Hoffm.	AF525275
A. hemionitis L.	AF240648	*A. septentrionale*	AF525248*
A. hemionitis	AF240663*	*A. serratum* L.	AF318602
A. hondoense N. Murakami & S. I. Hatanaka	AB014705	*A. setoi* N. Murakami & S. Serizawa	AB013243
A. hookerianum Wall.	AY283229	*A. shuttleworthianum* Kze.	AY283235
A. hybridum (Milde) A. J. Bange	AF240644	*A. tenuicaule* Hayata 细茎铁角蕨	AB014694
A. incisum Thunb. 虎尾铁角蕨	AB014697	*A. theciferum* (HBK.) Mett.	AF336099
A. jahandiezii (Litard.) Rouy	AF318590	*A. trichomanes* L. 铁角蕨	AF525276
A. jahandiezii	AY300068*	*A. trichomanes*	AF525237*
A. juglandifolium Lam.	AF525269	*A. tripteropus* Nakai 三翅铁角蕨	AB014699
A. laetum Sw.	AB014707	*A. unilaterale* Lam. 半边铁角蕨	AY459170#
A. lamprophyllum Carse	AY283230	*A. unilaterale*	AF240652
A. lolegnamense (Gibby & Lovis) Viane	AF538315	*A. viride* Huds. 欧亚铁角蕨	AF240649
A. majoricum Litard.	AF318587	*A. viride*	AF525238*
A. marinum L.	AF240647	*A. wilfordii* Mett. ex Kuhn 闵浙铁角蕨	AB014695
A. marinum	AF240662*	*A. wrightii* Eaton ex Hook. 狭翅铁角蕨	AB014690

*, *trn*L-F序列; #, *rps4-trn*S序列; 其余为*rbc*L序列。

* indicates *trn*L-F sequence, # indicates *rps4-trn*S sequence, and others are *rbc*L sequences.

1.4 序列分析

用CLUSTAL X软件(Thompson et al., 1997)进行对位排列。对位排列后的序列，用PHYLIP(Felsenstein, 1993)和MEGA2(Kumar et al., 2001)软件中的最大简约法(MP)和邻接法(NJ)进行系统发育分析。在简约法中采用branch-and-bound方法，邻接法分析中的遗传距离采用Kumar’s two-parameter 算法。在构建*rbc*L系统树时，根据Van den Heede等(2003)构建的系统树，以*Dennstaedtia samoensis*(基因库登录号为U18636)作为外类群；在构建*trn*L-F和*rps4-trn*S系统树时，由于没有*Dennstaedtia samoensis*的*trn*L-F和*rps4-trn*S序列，我们根据Schneider等(2004)构建的系统树，分别选择*Athyrium distentifolium* Tausch ex Opiz(基因库序列号为AY300047)和多变蹄盖蕨*Athyrium drepanopterum* (Kunze) A. Br. ex Milde作为外类群(本文测定)。

2 结果

8种新测定的铁角蕨属植物的*rbc*L、7种*trn*L-F基因间隔区和7种*rps4-trn*S区序列的GenBank收录号见表1。

为了探讨云南铁角蕨、泸山铁角蕨及其近缘类群在铁角蕨属植物中的系统位置，我们首先将本文所测定的8种铁角蕨属植物的*rbc*L序列与已经发表的相应序列(表3)进行系统发育分析，81种铁角蕨属植物*rbc*L序列排列后的总长度为1308 bp，无插入或缺失，其中438个位点为可变位点, 305个位点为信息位点。用两种常用的系统发生分析方法(MP和NJ)分别构建了铁角蕨属植物的系统发育树，不同方法所获得的系统树在拓扑结构上基本一致，仅在自展支持率上略有差异，本文仅列出用MP方法构建的系统树(图1)。依据*rbc*L系统树，分别用MP和NJ系统发生分析方法构建云南铁角蕨、泸山铁角蕨及其近缘类群的*trn*L-F和*rps4-trn*S系统发育树，两种方法所获得的系统树在拓扑结构上也基本一致(自展支持率略有差异，图1)。

云南铁角蕨、泸山铁角蕨及其近缘类群间的遗传距离计算结果显示: 5种铁角蕨植物的*rbc*L基因序列的遗传距离范围为0—0.024，泸山铁角蕨与云南铁角蕨的*rbc*L序列完全相同，序列间的遗传距离显示为0；5种铁角蕨植物间的*trn*L-F序列间的遗传距离介于0—0.248，泸山铁角蕨与云南铁角蕨的*trn*L-F序列也完全相同；5种铁角蕨植物间的*rps4-trn*S序列间的遗传距离介于0—0.133，序列图谱显示所测出的泸山铁角蕨与云南铁角蕨的*rps4-trn*S基因间隔区序列仅在长度上相差一个碱基，其余的位点则完全相同(表4)。

→

图**1** 采用Mega 2分析软件构建的铁角蕨植物最简约严格一致树 A. *rbc*L 系统树(1000次重抽样分析的自展值：分支上方为简约法抽样自展值，分支下方为邻接法抽样自展值)。B. *trn*L-F系统树(2000次重抽样分析的自展值：分支上方为简约法抽样自展值，分支下方为邻接法抽样自展值)。C. *rps4-trn*S系统树(上为简约树，下为邻接树，各分支上的数值为2000次重抽样自展值)。下画线的类群为本文新测定序列的种类。

Fig. 1. The strict consensus tree constructed with Mega 2 software. A, Tree based on *rbc*L sequences (bootstrap values of 1000 maximum parsimony analysis replicates are shown above branches, bootstrap values of neighbor-joining analysis are shown below branches). B, Tree based on *trn*L-F sequences (bootstrap values of 2000 maximum parsimony analysis replicates are shown above branches, bootstrap values of neighbor - joining analysis are shown below branches). C, Tree based on *rps4-trnS* sequences (the upper tree is constructed with maximum parsimony analysis, the tree below is constructed with neighbor-joining analysis, and bootstrap values of 2000 replicates are shown above branches). Taxa underlined are those species sequenced in this paper.

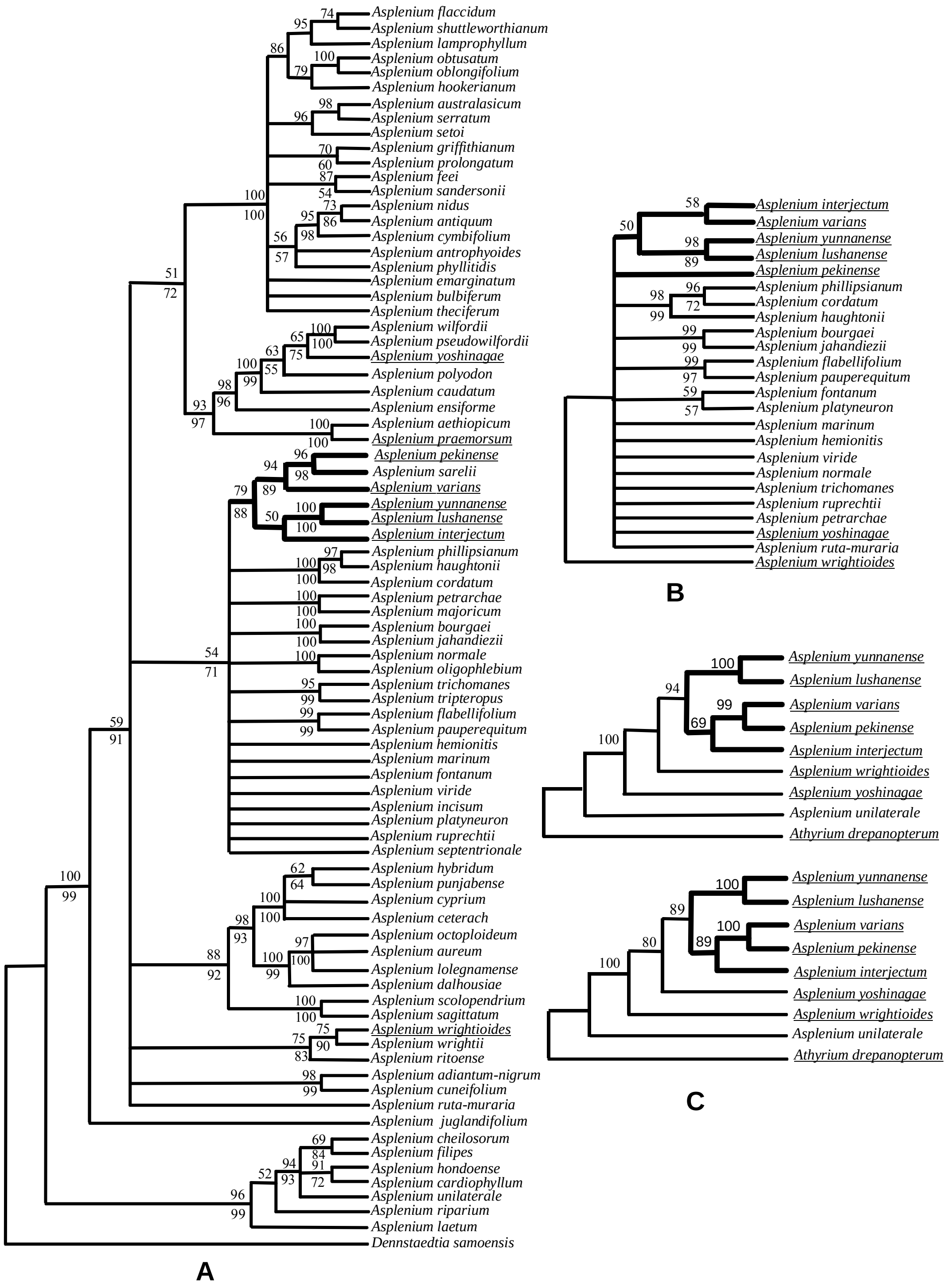
Asplenium flaccidum
Asplenium shuttleworthianum
Asplenium lamprophyllum
Asplenium obtusatum
Asplenium oblongifolium
Asplenium hookerianum
Asplenium australasicum
Asplenium serratum
Asplenium setoi
Asplenium griffithianum
Asplenium prolongatum
Asplenium feei
Asplenium sandersonii
Asplenium nidus
Asplenium antiquum
Asplenium cymbifolium
Asplenium antrophyoides
Asplenium phyllitidis
Asplenium emarginatum
Asplenium bulbiferum
Asplenium theciferum
Asplenium wilfordii
Asplenium pseudowilfordii
Asplenium yoshinagae
Asplenium polyodon
Asplenium caudatum
Asplenium ensiforme
Asplenium aethiopicum
Asplenium praemorsum
Asplenium pekinense
Asplenium sarelii
Asplenium varians
Asplenium yunnanense
Asplenium lushanense
Asplenium interjectum
Asplenium phillipsianum
Asplenium haughtonii
Asplenium cordatum
Asplenium petrarchae
Asplenium majoricum
Asplenium bourgaei
Asplenium jahandiezii
Asplenium normale
Asplenium oligophlebium
Asplenium trichomanes
Asplenium tripteropus
Asplenium flabellifolium
Asplenium pauperequitum
Asplenium hemionitis
Asplenium marinum
Asplenium fontanum
Asplenium viride
Asplenium incisum
Asplenium platyneuron
Asplenium ruprechtii
Asplenium septentrionale
Asplenium hybridum
Asplenium punjabense
Asplenium cyprium
Asplenium ceterach
Asplenium octoploideum
Asplenium aureum
Asplenium lolegnamense
Asplenium dalhousiae
Asplenium scolopendrium
Asplenium sagittatum
Asplenium wrightioides
Asplenium wrightii
Asplenium ritoense
Asplenium adiantum-nigrum
Asplenium cuneifolium
Asplenium ruta-muraria
Asplenium juglandifolium
Asplenium cheilosorum
Asplenium filipes
Asplenium hondoense
Asplenium cardiophyllum
Asplenium unilaterale
Asplenium riparium
Asplenium laetum
Dennstaedtia samoensis
A
Asplenium interjectum
Asplenium varians
Asplenium yunnanense
Asplenium lushanense
Asplenium pekinense
Asplenium phillipsianum
Asplenium cordatum
Asplenium haughtonii
Asplenium bourgaei
Asplenium jahandiezii
Asplenium flabellifolium
Asplenium pauperequitum
Asplenium fontanum
Asplenium platyneuron
Asplenium marinum
Asplenium hemionitis
Asplenium viride
Asplenium normale
Asplenium trichomanes
Asplenium ruprechtii
Asplenium petrarchae
Asplenium yoshinagae
Asplenium ruta-muraria
Asplenium wrightioides
B
Asplenium yunnanense
Asplenium lushanense
Asplenium varians
Asplenium pekinense
Asplenium interjectum
Asplenium wrightioides
Asplenium yoshinagae
Asplenium unilaterale
Athyrium drepanopterum
Asplenium yunnanense
Asplenium lushanense
Asplenium varians
Asplenium pekinense
Asplenium interjectum
Asplenium yoshinagae
Asplenium wrightioides
Asplenium unilaterale
Athyrium drepanopterum
C

表4 泸山铁角蕨、云南铁角蕨及近缘种类*rbc*L、*trn*L-F和*rps4-trn*S序列间的碱基差异和遗传距离
Table 4 Base difference and genetic distances between *rbc*L, *trn*L-F, and *rps4-trnS* sequences in *Asplenium lushanense*, *A. yunnanense* and thier close species

分类群 Taxon		*rbc*L					*trn*L-F					*rps4-trn*S				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	*A. varians*		13	29	29	29		22	25	25	25		18	56	51	52
2	*A. pekinense*	0.010		30	24	24	0.149		26	14	18	0.039		45	38	39
3	*A. interjectum*	0.023	0.023		31	31	0.233	0.248		18	18	0.133	0.105		48	49
4	*A. lushanense*	0.023	0.019	0.024		0	0.075	0.099	0.162		0	0.122	0.089	0.115		0
5	*A. yunnanense*	0.023	0.019	0.024	0.000		0.072	0.120	0.162	0.000		0.124	0.091	0.116	0.000	

3 分析和讨论

*rbc*L序列系统发育分析的结果显示：在所分析的81种铁角蕨植物中，云南铁角蕨和泸山铁角蕨与北京铁角蕨、黔铁角蕨、华中铁角蕨和变异铁角蕨构成一个自展支持率较高的分支(MP和NJ分析方法的抽样自展值分别为79和88)(图1)，这一分支又与倒挂铁角蕨、虎尾铁角蕨和铁角蕨等聚成抽样自展值较弱的分支。系统发育分析的结果表明云南铁角蕨和泸山铁角蕨与北京铁角蕨、黔铁角蕨、华中铁角蕨和变异铁角蕨具有较近的亲缘关系，这与传统分类相一致，因为在传统分类中，这6种铁角蕨属植物均属于铁角蕨组变异叶系(吴兆洪，1999)，而在这6种铁角蕨属植物中，云南铁角蕨与泸山铁角蕨无论是在简约树上还是在邻接树上均聚在一起，两种分析方法的抽样自展值均为100%(图1)，表明两者的亲缘关系很近。*trn*L-F和*rps4-trn*S系统发育分析也显示：云南铁角蕨和泸山铁角蕨与北京铁角蕨、黔铁角蕨和变异铁角蕨聚成一个分支，而*trn*L-F和*rps4-trn*S系统发育树均显示云南铁角蕨与泸山铁角蕨均聚成自展支持率较高的分支。

我们进一步探讨了所测铁角蕨植物叶绿体DNA片段的替代速率(表5)。表5显示叶绿体基因组中编码的基因序列(*rbc*L和*rps4*)的进化速率比较慢，而*rbc*L最慢；*trn*L-F、*rps4-trn*S基因间隔区的替代速率均较快：如*rps4-trn*S基因间隔区的替代速率是*rbc*L的约5倍，是*rps4*的约3倍。尽管*rbc*L进化速率较慢，但在其他铁角蕨植物种间还是存在差异，如与泸山铁角蕨和云南铁角蕨关系比较近的黔铁角蕨和变异铁角蕨间的*rbc*L遗传距离为0.023；而*trn*L-F和*rps4-trn*S基因间隔区间的遗传变异更大(遗传距离平均值分别为0.15和0.10)，但是泸山铁角蕨和云南铁角蕨无论是编码基因(*rbc*L)的序列，还是非编码区的基因间隔区序列(*trn*L-F和*rps4-trn*S)均不存在碱基替代。因此，分子序列的证据不能将云南铁角蕨与泸山铁角蕨分开。尽管如此，利用形态特征基本上可以区分云南铁角蕨与泸山铁角蕨，存在过渡特征说明这两个物种有着亲缘关系，可能有着共同的祖先，其形态特征才会出现特征渗透现象。细胞学的研究表明泸山铁角蕨为二倍体，而云南铁角蕨为四倍体(Wang et al., 2003)，无论染色体是否同源，都已在细胞层次上证明这两个物种是独立的。至于分子序列的证据不能将两个物种分开，所测的基因序列间的差异很小，这更进一步证明这两个物种有着密切的亲缘关系。因此本文的分子系统学方面的资料进一步表明云南铁角蕨与泸山铁角蕨是一对亲缘关系非常密切的物种。

表5 铁角蕨4个叶绿体DNA片段替代速率的比较*
Table 5 Substitution rate for several genes in *Asplenium**

DNA片段 DNA fragment	长度1) Length (bp)	总替代速率2) Total substitution rate	非同义替代速率3) Nonsynonymous substitution rate
*rbc*L	1358	0.0664±0.0074	0.0760±0.0095
*trn*L-F	404	0.1559±0.0218	
rps4	578	0.1067±0.0148	0.0959±0.0166
*rps4-trn*S	337	0.3117±0.0390	

**Asplenium scolopendrium*与*A. unilaterale*相比; 1) 在*A. scolopendrium*中的碱基对数目; 2) Kimura-2参数遗传距离; 3) Li-Wu-Luo 遗传距离。

*Comparison between of *Asplenium scolopendrium* and *A. unilaterale*; 1) Number of base pair in *A. scolopendrium*; 2) Genetic distance of Kimura-2 parameter; 3) Genetic distance of Li-Wu-Luo.

致谢 中山大学施苏华教授提出诸多技术和学术意见; 李建伟博士(Dr. Jianwei (Jerry) Li in Institute for Genomic Research at Rockville, Maryland 20850 of USA)修改英文摘要, 谨表谢忱。

参 考 文 献

Felsenstein J.1993. Phylogeny Inference Package (PHYLIP), Version 3.5. University of Washington, Seattle, USA.

Hennequin S, Ebihara A, Ito M, Iwatsuki K, Dubuisson J Y. 2003. Molecular systematics of the fern genus *Hymenophyllum* s.l. (Hymenophyllaceae) based on chloroplastic coding and noncoding regions. Molecular Phylogenetics and Evolution 27: 283–301.

Hillis D M, Mable K, Larson A, Davis S K, Zimmer E A. 1996. Sequencing and cloning. In: Hillis D M, Moritz C M, Mable B K eds. Molecular Systematics. Sinauer Sunderland, Massachusetts, USA. 321–384.

Kung H-S (孔宪需). 1988. Flora Sichuanica (四川植物志). Chengdu: Sichuan Science and Technology Press. 6: 367–372.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Bioinformatics 17: 1244–1245

Little D P, Barrington D S. 2003. Major evolutionary events in the origin and diversification of the fern genus *Polystichum* (Dryopteridaceae). American Journal of Botany 90: 508–514.

Li C-X, Lu S-G, Yang Q. 2004. Asian origin for *Polystichum* (Dryopteridaceae) based on *rbc*L sequences. Chinese Science Bulletin 49: 1146–1150.

Schneider H, Russell S J, Cox C J, Bakker F, Henderson S, Rumsey F, Barrett J, Gibby M, Vogel J C. 2004. Chloroplast phylogeny of asplenioid ferns based on *rbc*L and *trn*L-F spacer sequences (Polypodiidae, Aspleniaceae) and its implications for biogeography. Systematic Botany 29: 260–274.

Shi S-H (施苏华), Zhang Q (章群), Chen Y-Q (陈月琴), Tang S-Q (唐绍清), Qu L-H (屈良鹄). 1996. A simple method for isolation of total RNA and DNA from silicagel-dried and fresh leaves of plants. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni (中山大学学报) 35: 103–105.

Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology 17: 1105–1109.

Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The ClustaX windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. Nuclear Acids Research 24: 4876–4882.

Van den Heede C J, Viane R L L, Chase M W. 2003. Phylogenetic analysis of *Asplenium* subgenus *Ceterach* (Pteridophyta: Aspleniaceae) based on plastid and nuclear ribosomal ITS DNA sequences. American Journal of Botany 90: 481–495.

Wang Z-R (王中仁), Wang K-Q (王可青), Zhang F (张方), Hou X (侯鑫). 2003. A biosystematic study on *Asplenium sarelii* complex. Acta Botanica Sinica (植物学报) 45: 1–14.

Wu S-H (吴兆洪). 1999. Pteridophyta. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志). Beijing: Science Press. 4 (2): 1–254.